



## アルドキシムデヒドラターゼのユニークな触媒機能

著者	山田 優駿
内容記述	この博士論文は内容の要約のみの公開（または一部非公開）になっています
発行年	2017
学位授与大学	筑波大学 (University of Tsukuba)
学位授与年度	2017
報告番号	12102乙第2841号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2241/00149913">http://hdl.handle.net/2241/00149913</a>

## アルドキシムデヒドラターゼのユニークな触媒機能

株式会社日陸

氏名：山田 優駿

### 論文要約

アルドキシムデヒドラターゼ(OxdA)は、当研究室におけるニトリル(R-C≡N)代謝に関する研究の中で発見された酵素である。本酵素は、かつてアクリロニトリルからアクリルアミド工業生産の第二世代菌として使用された *Pseudomonas chlororaphis* B23 株(以下、B23 株)のニトリル代謝クラスター(Fig. 1-1-1)の上流に発見された。当研究室での先行研究により、本酵素はヘム酵素ではあるが、ヘムの第5配位子が(ヘモグロビンやペルオキシダーゼなどと同様に)His 残基であり、ヘムタンパク質としての特徴を持ち合わせながらも、触媒する反応は酸化還元反応ではなく、ヘムに基質が直接アプローチするなど、従来のヘムタンパク質では見られない希有な新現象を有することも判明している。

OxdA が脱水反応を触媒する一方、ほとんどのヘム酵素は、カタラーゼ、ペルオキシダーゼ、ペルオキシゲナーゼなどの酸化還元反応を触媒する。ヘム酵素による酸化還元反応の研究が進む中で、酸素輸送に関わるヘムタンパク質であるミオグロビンにも酸化還元反応が報告され、さらに、海綿由来のクロロペルオキシダーゼの活性中心を参考に、His64 をアスパラギン酸に置換した H64D ミオグロビンは、野生型ミオグロビンの数十~数百倍の酸化還元活性を示した。これらの報告は、(酸化還元反応を触媒せず、脱水反応を触媒する)ヘム酵素である OxdA でも、同活性を触媒できる可能性を示唆し、同時に、同様の変異を加える事で酸化還元活性が強化できる可能性を示唆した。そこで本研究では、クロロペルオキシダーゼの活性中心を参考に OxdA の変異体を作成し、さらに、参考研究で得られている、His320 残基をアラニンに置換し (アルドキシムデヒドラターゼ活性を持たない)、活性中心のチャージを除いた変異体を用い、野生型 [OxdA(WT)]と変異体の酸化還元反応触媒能を、カタラーゼ、ペルオキシダーゼ、ペルオキシゲナーゼ活性を指標として検討することを目的とした。

まず、クロロペルオキシダーゼを参考に、OxdA のヘムの His320 残基をアスパラギン酸に置換した変異体、OxdA(H320D)の作成を行った。作成した pET/oxdA(H320D)ベクターと、先行研究により得られていた pET/oxdA ベクターを、それぞれ BL21codonplus(DE3)RIL に導入し、OxdA(WT)および OxdA(H320D)を大量発現させ、それぞれを各種クロマトグラフィーで精製し、各種活性測定に用いた。

はじめに過酸化水素の持つ 240 nm の吸収を測定することで、OxdA(WT)のカタラーゼ活性を検討した。測定の結果、非常に微量な 240 nm の吸収の減少が確認されたが、反応中、OxdA 自体の吸収が大幅に減少しており、240 nm の減少は、同活性の基質である  $\text{H}_2\text{O}_2$  の分解を直接示すものではないことが分かった。そこで、より高感度でカタラーゼ活性を検出できる酸素電極を用いたところ、OxdA カタラーゼ活性の検出に成功し、キネティックパラメーターの決定にも成功した。つづいて、OxdA(H320D)と、活性中心のチャージを除いた変異体 OxdA(H320A)のカタラーゼ活性について、酸素電極を用い測定した結果、それぞれの同活性は検出され、キネティックパラメーターを決定した結果、OxdA(H320D)は野生型の約 30 倍の活性を示した。一方、OxdA(H320A)は活性の強さは野生型とほぼ同じだったが、野生型より約 10 倍高い基質との親和性を示した。

次にペルオキシダーゼ活性の検討を行った。本測定では基質として過酸化水素以外に、グアイアコールもしくは ABST を用いた。産物の増加量を定量して本活性を測定した結果、OxdA(WT)と変異体のそれぞれのペルオキシダーゼ活性が検出され、OxdA(H320D)の活性は野生型に比べ、5~10 倍高い事が判明した。また、OxdA(H320A)の活性は、いずれも野生型より数倍低く、さらに基質との親和性も野生型より低かった。

つづいて、ペルオキシゲナーゼ活性の検討を行った。本測定では基質として過酸化水素と 1-メトキシナフタレンを用いた。産物であるルッシングズブルーの増加量を定量して本活性を測定した結果、OxdA(WT)のペルオキシゲナーゼ活性は検出されたが、OxdA(H320D)においては、ルッシングズブルーの生成は確認されず、その反応溶液は野生型とは全く異なる色を呈した。このことは、OxdA(H320D)において、全く異なる産物が生成されたことを示唆した。また、OxdA(H320A)は一切の発色反応を示さず、1-メトキシナフタレンを基質とした触媒反応を触媒しないと考えられた。

最後に、OxdA(H320D)の未知のペルオキシゲナーゼ反応産物の同定を行った。未知の反応産物は、酢酸エチル抽出により抽出し、HPLC で精製した。精製した産物は、LC/MS により、分子量を測定し、NMR により、4-メトキシ-3-ナフタレノールと同定した。さらに、精製した産物から、4-メトキシ-3-ナフタレノールのモル吸光係数を算出し、それを用いて OxdA(H320D)のペルオキシゲナーゼ活性を検出、キネティックパラメータを決定した。その結果、OxdA(H320D)のペルオキシゲナーゼ活性は、OxdA(WT)の約 6 倍高い事が分かった。

今回の研究で、我々は OxdA が酸化還元反応を触媒することを初めて実証した。また、OxdA の His320 残基は、基質の配位や親和性と密接に関係していることが分かった。さらに OxdA(H320D)の変異は、OxdA の酸化還元活性を増強

し、新しい機能を付与することを実証した。